

総 説

生体内酸化LDL仮説の再評価とこれからの課題

板部洋之

昭和大学薬学部 生物化学教室

要 旨

酸化LDL仮説は動脈硬化症の発症、進展の機序を説明するものとして広く受け入れられてきた。著者は、血漿中の微量の酸化LDLを定量し、LDLの酸化変性が心血管疾患の重要な要因であることを明らかにした。しかし、抗酸化ビタミンの抗動脈硬化作用を疫学的に証明することは困難であった。近年の新たな展開により、再び酸化LDLの臨床的な意義が評価されるようになり、また今後、酸化LDLが生体内の酸化ストレスを示す有用なマーカーとなる可能性が期待される。

Key words：酸化LDL，動脈硬化症，モノクローナル抗体，予後診断，歯周病

1. はじめに

動脈硬化症は急性心筋梗塞に代表される心血管疾患や脳血管疾患の基礎病態である。心血管疾患、脳血管疾患は、現代日本人の死因の第2位と第3位であり、国民の健康向上のための大きな問題となっている。動脈硬化症の発症には、高コレステロール血症などの脂質代謝異常、肥満、インスリン抵抗性、炎症、あるいは感染症など、多様ないくつかの要因が関わっている。とくに酸化ストレスは、スカベンジャー受容体の発見と同日、血中酸化LDLの検出などの具体的な研究成果により、動脈硬化の発症、進展に関わる要因として広く受け入れられてきた。著者は、生体内酸化LDLの高感度検出法を構築し、LDLの酸化変性が心血管疾患の重要な一要因であることを明らかにしてきた¹⁾。しかしながら、疫学的には抗酸化ビタミンの臨床的な効果が簡単には証明されず、酸化LDL仮説がどこまで適応できるのか模索の時期も必要であった。近年、いくつかの新たな展開があり、再び酸化LDLの臨床的な意義が評価されるようになってきている。本稿では、心血管疾患

と酸化LDLの研究の背景、さらに酸化LDL仮説の現状、今後の展開に向けた課題などについて概説したい。

2. 動脈硬化症の酸化LDL仮説

動脈硬化巣では、血管内皮細胞の層である血管内膜と血管平滑筋層である中膜との間に多量の脂質、コラーゲン等の細胞間物質、そして多数の細胞の蓄積が認められる。ここに浸出する細胞はおもにマクロファージであり、一部平滑筋細胞も見られる。これらの細胞が細胞質内に多数の脂肪滴を形成し、コレステロールやトリアシルグリセロールを蓄積し、泡沫細胞を形成することが動脈硬化巣の特徴である(図1)。マクロファージの培養系にLDLを添加しても脂質の蓄積は亢進しないが、アセチル化修飾されたLDL(アセチルLDL)や酸化変性を受けたLDL(酸化LDL)によって泡沫細胞が形成することから、修飾LDLに対する特異的受容体の存在が示され、スカベンジャー受容体と名付けられた。アセチルLDLとの結合性からSR-A、また酸化LDLとの結合性から

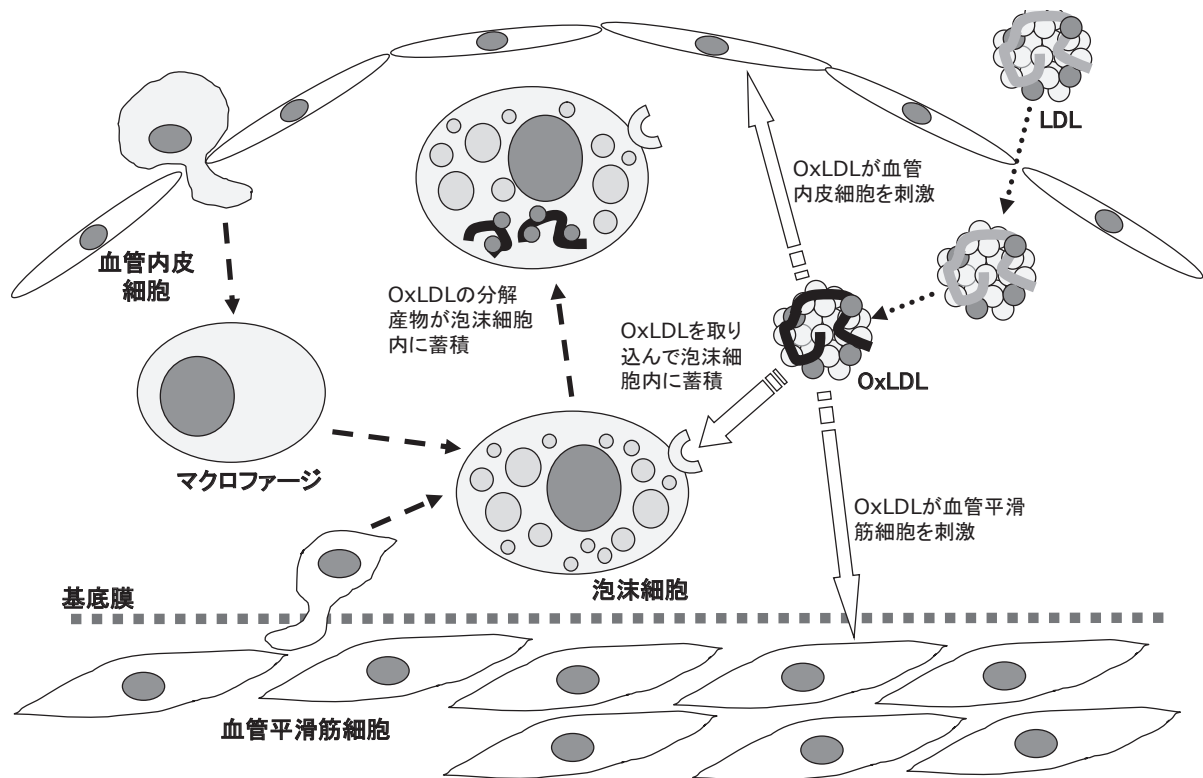


図1 酸化LDL仮説に基づく動脈硬化巣の形成における酸化LDLの関わりを示した模式図

血漿から血管壁の内皮下(内膜)に浸みこんだLDLが酸化変性を受ける。内膜に浸潤したマクロファージや平滑筋細胞が酸化LDLを取り込み、脂質を蓄積した泡沫細胞が形成される。酸化LDLは完全には代謝されないで、分解産物が泡沫細胞内に蓄積する。また酸化LDL血管内皮細胞や血管平滑筋細胞にも働きかけて、さまざまな炎症性反応を引き起こす。刺激された細胞から分泌されるサイトカインなどの因子によりさらにマクロファージや好中球が浸潤し、あるいは血管新生などの反応が起こり、病巣形成が進展する。

CD36が泡沫細胞形成を促すスカベンジャー受容体として同定されたのに続き、これまでに10種類以上のスカベンジャー受容体が見つかった²⁾。血管内皮細胞にLDLを添加して共培養すると培地中のLDLが酸化されることから、血管組織でLDLが酸化される可能性が提示された。また、酸化LDLはマクロファージ、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞などの血管組織の細胞を刺激し、さまざまな炎症性反応を惹起する。酸化変性を受けたLDLが、スカベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれ、泡沫細胞がつくられるとともに、炎症反応を亢進して病巣形成を促すと考えられるようになった^{3, 4)}。

2. 血漿酸化LDL

酸化LDL仮説により動脈硬化症の発症の流れが説明されるのであるが、この仮説が注目された当初、生体内に酸化LDLが存在するかどうかの証拠は得られていなかった。硫酸銅処理で調製し

た酸化LDLを放射標識しラットの下腿動脈から注入すると、放射性物質は急速に肝臓にトラップされ、数分以内に血中からはほぼ消失することから、酸化LDLは血中では安定的には存在できず、血中には酸化LDLはほぼ存在しないと想定されていた⁵⁾。

著者らは、ヒト動脈硬化巣ホモジェネートを免疫源として動脈硬化病巣に蓄積する物質に対する抗体を作製する試みの中から、酸化LDLに強く結合するモノクローナル抗体の作製に成功した⁶⁾。DLH3抗体は、未処理LDL、アセチルLDL、マロンジアルデヒド処理LDLとは結合せず、酸化LDLに強く反応した(図2A)。注目すべきことに、酸化HDLに対しても強く反応したことから、酸化LDLや酸化HDLのアポリポタンパク質部分ではなく、脂質由来の成分を認識していると考えられた。ホスファチジルコリン(PC)を鉄イオン処理で酸化しても抗原性が現れることから、酸化PC中の抗原物質を探索してアルデヒド型などの

酸化PCを抗原分子として分離同定した(図2B)⁷⁾. DLH3抗体を用いてヒト, ウサギの大動脈や冠状動脈の動脈硬化病変部を免疫組織化学染色すると, 泡沫細胞に一致してDLH3抗原物質の沈着が認められた^{6, 8)}. さらに, 抗apoB抗体との二重染色をすると, 同じ泡沫細胞が両抗体で同時に染色され, 酸化PCとapoBが共存していることが示され, 酸化LDLの取り込みを経て泡沫細胞が形成されていることが確かめられた.

前述のように, 血中の酸化LDLは存在するとしても非常に微量である可能性があり, 感度の高い検出系を構築する必要があった. 酸化LDL中の酸化PCを認識するDLH3抗体とapoBタンパクを認識する抗体を組合せて用い, 酸化LDL粒子の異なる2カ所の部分構造を捕捉するサンドイッチELISA法を構築し, 血漿中の微量の酸化LDLを定量することに成功した^{9, 10)}. 測定結果から, 健常者の血漿LDL1 μ g中でも0.1 ~ 0.2ngの酸化LDLが存在していると推計された. この酸化LDLレベルは, 急性心筋梗塞患者で有意に高値となることが見出され, 血中酸化LDLが心血管疾患の病態と深く関わっていることが強く示唆された⁸⁾.

上田らとの共同研究により, 急性心筋梗塞患者

の急性期において, 血漿酸化LDLレベルの著しい上昇が見出された(図3A)^{8, 11)}. 急性心筋梗塞は非常に重篤な疾患であり, 緊急の処置を要する. 近年, 血栓を取り除いて血流を再開通させるカテーテル治療が進歩し, 救命率が上昇してきている. 急性心筋梗塞患者の酸化LDLレベルは, カテーテル治療後の安定期になると健常レベル近くにまで低下した¹¹⁾. 宇野らとの共同研究においても, 脳梗塞急性期に一過的な血漿酸化LDLレベルの上昇を見出し, その後定常レベルに回復した¹²⁾. これらの疾患の急性期に見られる酸化LDLレベルの一過の上昇は, プラークの破綻に伴って病巣中の酸化LDLが血流中に漏れ出してくるためであると考えられている.

Holvoetら, あるいはTsimikasらのグループも独立にモノクローナル抗体を用いた血漿酸化LDLの測定系を構築している. 著者らの方法とは, 用いている抗体の特異性, 測定条件, 標準物質などに違いがあるため, 測定値の比較は困難であるが, 急性心筋梗塞患者において高値となる結果は良く一致している^{13, 14)}. 酸化LDL測定法の比較, 疫学データの対応関係については, 総説に詳しくまとめているので参照されたい¹⁵⁾.

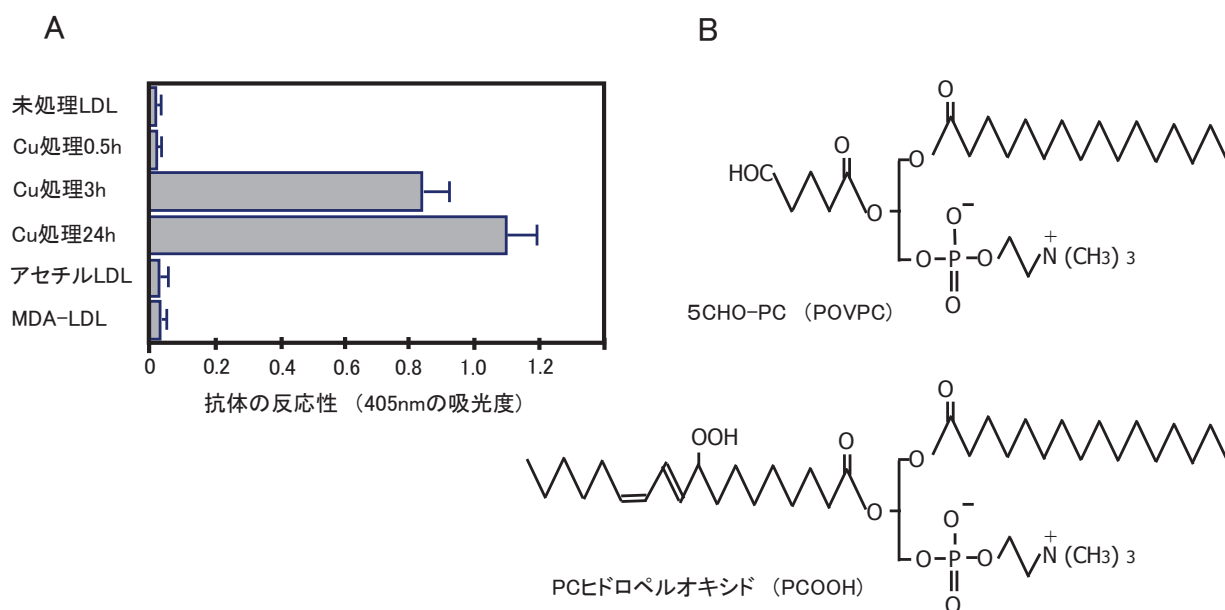


図2 モノクローナル抗体DLH3の反応性

(A)種々の修飾LDLをマイクロプレートにコートし, DLH3抗体の反応性をELISA法で調べた. DLH3抗体は, 未処理LDLには反応性せず, 硫酸銅で3時間あるいは24時間インキュベートして調製した酸化LDLに強く結合した. 0.5時間の硫酸銅処理では, まだ酸化反応自体が進んでいない. アセチル化やマロンジアルデヒド(MDA)で修飾したLDLにも反応しない. (B) DLH3抗体はホスファチジルコリン(PC)の酸化物の中でも, アルデヒド体やヒドロペルオキシド体などに強く反応した.

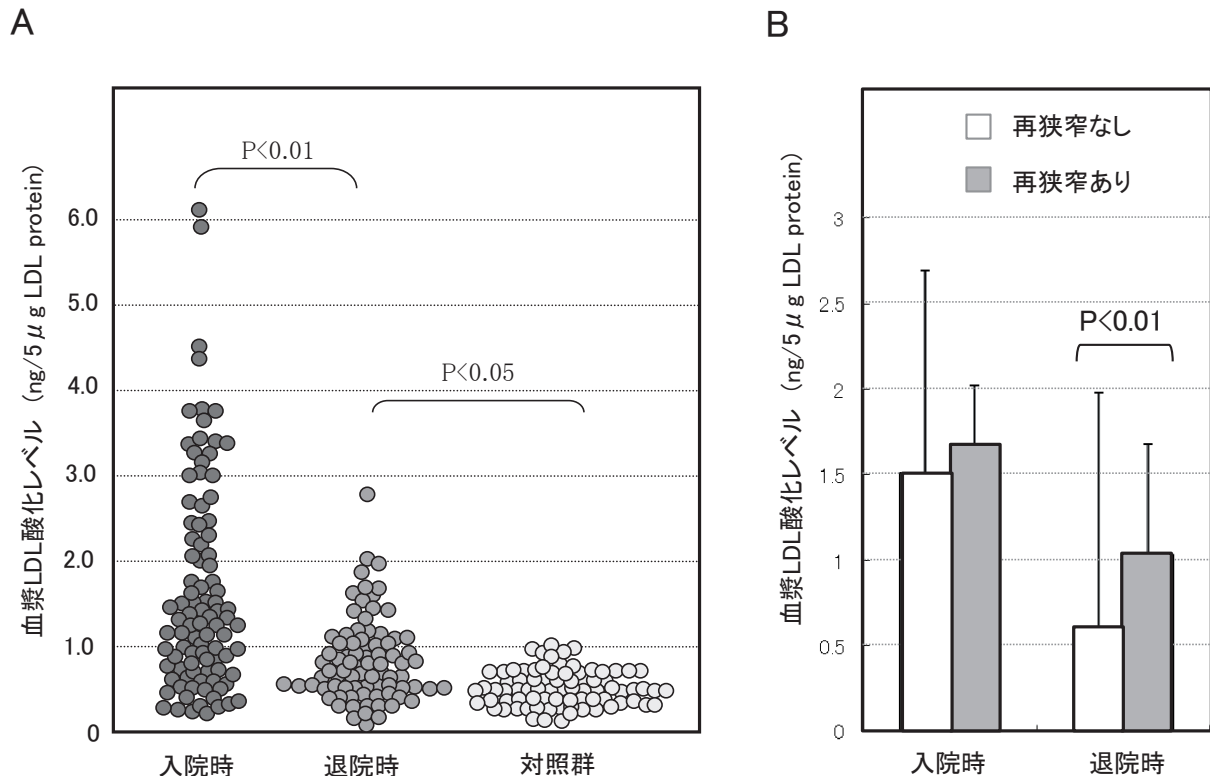


図3 急性心筋梗塞患者の血漿酸化LDLレベル

(A)急性心筋梗塞患者の入院時(急性期)と同じ患者の退院時(安定期)の血漿酸化LDL レベルを測定した。患者の酸化LDLレベルは対照群に比べ有意に高値であった。同じ患者群でも退院時には酸化LDLレベルが有意に低下した。但し、一部にはまだ高い値を示した患者がいる。(B)これらの患者を6ヶ月間経過観察し、その間に再度心血管イベントを起こさなかった患者群と再狭窄等により入院等が必要になった患者の2群に分けて、入院時、退院時の酸化LDLレベルを比較した。入院時の酸化LDLレベルには差が無く、退院時の酸化LDLレベルは再狭窄なし群が有意に低値であった。(文献11より一部改変して引用。)

著者らが測定している血漿酸化LDLレベルは、血漿から遠心分離したLDL画分を用いて測定しているため、一定の血漿液中中の酸化LDLではなく、一定量LDL当たりの酸化LDL量を測定している。従って、この値はLDLのうち酸化変性を受けたものの割合を示すことになる。実際、酸化LDLレベルは、血漿総コレステロールやLDLコレステロールとは相関せず、喫煙による変動も認められない⁸⁾。

3. 酸化LDL 仮説の現状

血漿酸化LDLの上昇は、動脈硬化症の原因であるのか、あるいは病巣が進展した結果であるのか、かねてより議論されてきた問題である。1990年代のスカベンジャー受容体の相次ぐ発見とクローニング、血漿酸化LDLの検出などの成果から酸化LDL仮説が広く受け入れられてきた。それとともに、抗酸化作用の薬物治療の可能性に関して多くの疫学研究が行われてきたが、動脈硬化を抑

制したとするものから、全く効果がみられなかったとするものまで、その結果はまちまちであった。2003年に抗酸化ビタミン摂取の抗動脈硬化作用に関する疫学研究のメタ解析の結果が報告された。1000人以上の患者を対象とした無作為割り当て試験7件のデータを総合的に調べたところ、「ビタミンEや β カロテン摂取が心筋梗塞による死亡率の減少、脳梗塞による死亡率の減少、総死亡率の減少に有意な効果があるとは判定できない」という評価が下された¹⁶⁾。少なくとも薬物治療戦略として抗酸化作用をターゲットとする試みにややブレーキが掛かってしまった。

しかしその後、また新たな見方を示唆する研究成果がいくつか報告されてくるようになった。Levyらのグループは、被検者の遺伝的素因によって*in vivo*でのビタミンEの抗酸化の効果が異なることを示した¹⁷⁾。血漿タンパク質の一つハプトグロビン、ヘモグロビンの分解により遊離した鉄イオンを結合してマクロファージに受け渡して

処理を促す作用を持ち、抗酸化的環境を維持する働きがある。ハプトグロビンには遺伝的に1アミノ酸置換したHp1, Hp2のアイソタイプがあり、各個人にはHp1-1, Hp1-2, Hp2-2の遺伝型がある。鉄イオン結合能はHp1の方が優れているため、この遺伝子型によって血中の遊離鉄イオン濃度が異なり、抗酸化環境に差がでる。55歳以上の2型糖尿病患者3000人以上をHp遺伝子型でグループ分けしたところ、Hp2-2遺伝子を持つ被検者群は、Hp1-1群, Hp1-2群よりも有意に1年半の間の追跡期間中の心血管疾患イベント発症率が高かった。そこでHp2-2群にビタミンEを摂取させたところ、心血管疾患イベント発症率は有意に低下し、Hp1-1, Hp1-2と同程度になった。つまり、ハプトグロビンの抗酸化作用が十分に発揮されず酸化ストレスが亢進している被検者においては、ビタミンEの摂取が非常に大きく寄与するのである。

生体に本来備わっている抗酸化機構が抗動脈硬化的に重要であることは、いくつかの遺伝子改変実験で示されてきている。酸化ストレス応答性のタンパク質でヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)の活性抑制により、LDL受容体欠損マウスの動脈硬化病変が増大した¹⁸⁾。また、 H_2O_2 の消去酵素であるペルオキシレドキシン (Prx)-2とapoEのダブルノックアウトマウスでは、動脈硬化病変の形成が増強した¹⁹⁾。抗酸化ビタミンなどの補充療法は、生体に本来備わっている抗酸化機構の補完的であるため、生体の恒常性が維持されている状態ではその効果が見えにくいと理解される。

血中酸化LDLは、これまでに心血管疾患、脳血管疾患、人工透析患者などで有意に高値となることが示されてきた¹⁵⁾。一方で血中酸化LDLは動脈硬化症の進展の結果なのではないかという疑問が常に提示されてきたが、近年、酸化LDLが心血管疾患の予後を予測するマーカーとなりうることを示されつつある。成子らは、心筋梗塞患者102名の血漿酸化LDLレベルと退院後の予後を追跡したところ、患者のうち退院後6ヶ月の間に再狭窄を起こした狭窄群25名と、6ヶ月間心事故の無かった再狭窄群と比較すると、両群の入院時酸化

LDLレベルには差が見られなかったが、狭窄群の退院時酸化LDLレベルは再狭窄なし群77名より有意に高いことを明らかにした(図3B)¹¹⁾。退院時でもなお酸化LDLレベルが高いことは、強い酸化ストレスが持続的に与えられている状態を示唆していることから、安定時の酸化LDLが病変部の状況をより良く反映する可能性が考えられる。

apoE-KOマウスは高コレステロール血症を呈し、動脈硬化を自然発症するモデル動物として、世界中で汎用されている。当教室では、apoE-KOマウスの大動脈硬化巣の進展と血漿酸化LDLの変動経過を検討した²⁰⁾。普通食で飼育したapoE-KOマウス大動脈に形成された病巣面積は、生後10週では大動脈全体のわずか1%、20週で約3%にすぎないが、その後大きく進展し生後40週には約35%にまで達する。一方、apoE-KOマウスの血漿酸化LDLレベルは20週をピークに一過的な上昇を見せた(図4)。20週齢では病巣が未発達であり、ここではプラーク破綻による漏出によるものではなく、病巣形成に先立って酸化LDLが形成されることを示している。動脈硬化巣の進展に先立って血漿酸化LDLが増加することは、生体内酸化LDLが動脈硬化の進展要因である可能性が示唆される。

4. 残された課題と今後の展開

4-1. 血漿酸化LDLの実体

血漿中の酸化LDLが具体的にどのような構造の産物であるか、未だにきちんとした解析がなされていない。もとのLDLが分子量200kDaの巨大タンパク質であるapoBと多数の脂質分子との複合体であり、さらにこれが酸化反応を受けて様々な修飾を受けていることで、化学構造としての複雑さが非常に大きいこと、さらに血漿中の酸化LDLの存在量が非常に微量であることから、血漿中の酸化LDLの単離と構造解析はなかなか進んでいないのが現状である。酸化LDLの疾患への関わりとその機構を解明するため、あるいは生体内での酸化ストレスの本体を明らかにするためには、ぜひ酸化LDLそのものの実態を明らかにすることが必要である。

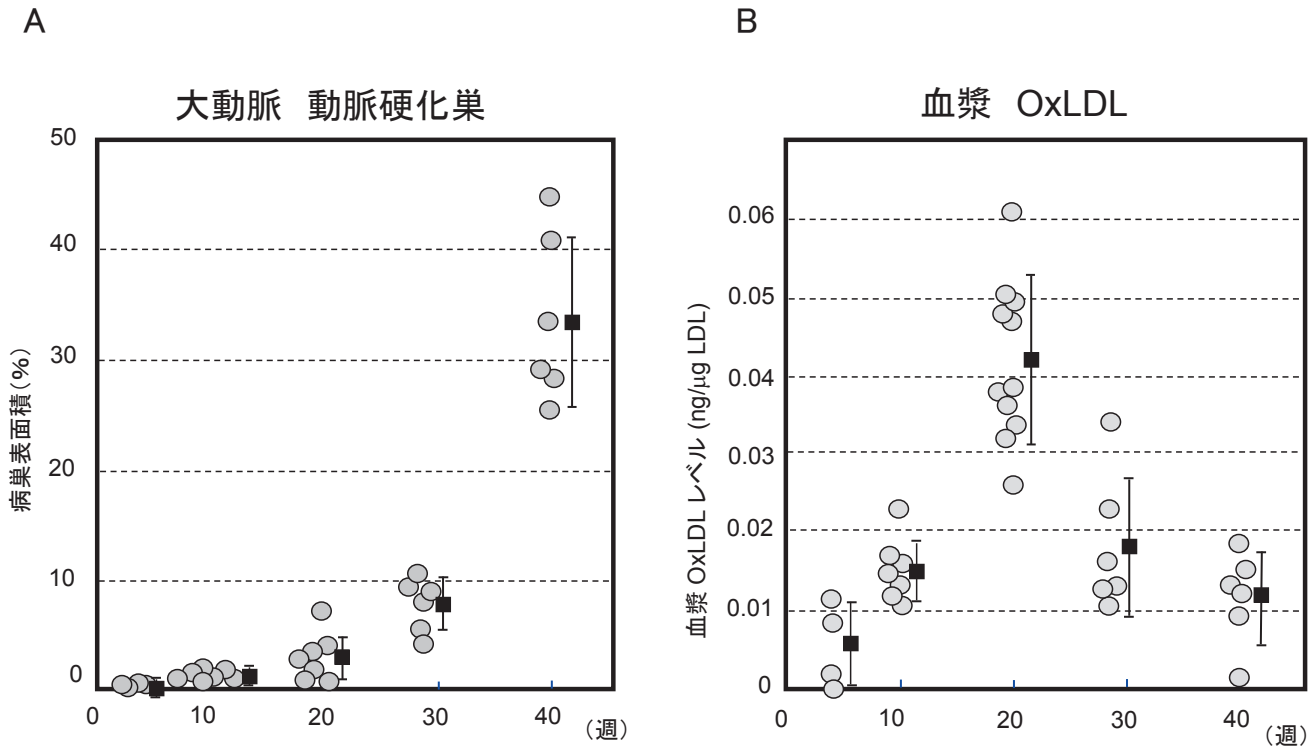


図4 apoE-KOマウスの動脈硬化進展と血漿酸化LDLの経時変化

(A) apoE-KOマウスを通常食で40週まで飼育したときの、大動脈にできた病巣の面積の割合を示した。apoE-KOマウスは10週まではかすかに小さな病変がで始める程度であり、生後20週を過ぎてから動脈硬化巣の著しい進展が見られた。(B)同じapoE-KOマウスの血漿酸化LDLレベル。血漿酸化LDLレベルは、20週で最も高値であり、血漿酸化LDLは病巣進展に先立って一過的な上昇を起こした。(文献20より一部改変して引用。)

リポタンパク質の一種Lp(a)が心血管疾患患者で高値であるとしてリスク因子の候補とも考えられている。Tsimikasらは、酸化ホスファチジルコリンを結合しており、血漿中の酸化LDLはLp(a)と挙動が一致すると主張している²¹⁾。Lp(a)は、LDLのapoBタンパク質にapo(a)という別のタンパク質がジスルフィド結合で付加したものである。apo(a)は、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI-1)や血液凝固因子に良く見られるクリングルドメインを多数持つタンパク質であるが、その生理的な機能はまだ分かっていない。apo(a)の分子サイズ、つまりクリングルドメインの数には、人種差、個人差があり、一定していない。また、apo(a)タンパク質の発現レベルはその分子サイズと逆相関すると言われ、これも個人差がある。Lp(a)が酸化的修飾を受けた分子の運搬体であるというのは魅力的な仮説であるが、Lp(a)発現の人種差、個人差と血漿酸化LDLレベルとが一致しない可能性があり、今後の検討が必要であろう^{22, 23)}。

当教室では、DLH3抗体を用いて血漿酸化LDLのアフィニティ精製を試みてきた。微量の酸化LDLの構造的特徴を解析するためには、質量分析法を用いた修飾タンパク質、及び脂質の分子種分析が有効であり、現在、生体内酸化LDLに特徴的な分子構造の探索を行っている²⁴⁾。

4-2. 酸化LDLの由来

生体内の酸化LDLは、いつ、どこで生じるのか。急性心筋梗塞患者の血漿酸化LDLは既に進展した動脈硬化病巣から漏れ出たものである。とすると、それ以前に酸化LDLが生成したはずである。apoE-KOマウスの検討でも、動脈硬化病変の形成ごく初期に血漿酸化LDLの増加が示された²⁰⁾。従来の酸化LDL仮説では、で始めた動脈硬化病変にマクロファージなどの炎症性細胞が集積し、酸化反応も起き易い環境になると考えてきたが、それ以上の詳細な説明はない。むしろ、病巣が形成される以前、あるいは別の場所で酸化反応が起こる可能性も考えるべきなのかもしれない。

当教室でのapoE-KOマウス大動脈の免疫組織化学的検討で、病巣形成のごく初期である10週の時点で中膜にびまん性に脂質酸化物の沈着が認められ、酸化反応が既に起きている可能性が考えられた。少なくとも一部はapoBと酸化物とが共局在しており酸化LDLの存在が強く示唆されるが、apoBや中性脂質の沈着と一致しない酸化物も存在する。このことから、血管平滑筋層において、平滑筋細胞が酸化ストレスの一因を生じさせている可能性を考えたい。病巣形成ごく初期の大動脈のうち動脈硬化病変好発部位とそうでない部位を分けて、二次元電気泳動と質量分析法を用いて、発現レベルの異なるタンパク質を検索し、現在いくつかの候補タンパク質が見出している。一見正常な血管であっても平滑筋細胞が経時的に変化し、酸化ストレスもそこで生じている可能性は、今後さらに検討されるべきものと考えている。

4-3. 他の疾患と酸化LDL

近年、高齢者の歯を失う主な原因である歯周病が、生活習慣病の一つとしても注目されつつある。歯周病は口腔内の細菌感染が原因となって生じる慢性炎症疾患で、*Porphyromonas gingivalis*などの起炎菌が解明されている。細菌感染により歯肉の炎症が進展し、歯槽骨吸収が起こり、歯肉が退縮して歯を支えられなくなり、症状が進むと歯が脱落してしまう。近年、多くの疫学的検討から歯周病が糖尿病などに関連することが指摘されている²⁵⁻²⁷⁾。歯周病患者は糖尿病や高脂血症を併発し、逆に糖尿病患者は歯周病を併発している場合が多い。適切な歯周病治療により、糖尿病が改善することも報告されている²⁸⁾。

当教室では、昭和大学歯学部歯周病学教室との共同研究で、歯肉局所における酸化ストレスの亢進を評価する系を構築している。歯肉溝浸出液は、歯と歯肉の間隙である歯肉溝に浸み出しているごく少量の組織液であり、先の細い針状のろ紙を用いて、痛みを伴わずに採取できる(図5A)。まず、健常者の歯肉溝浸出液を採取して調べてみたところ、ここにLDLが含まれ、酸化LDLも存在することを見出した²⁹⁾。特筆すべきことは、同じ被検

者の血漿LDL画分と比較すると、歯肉溝浸出液中の酸化LDLは、LDL当りにして10倍以上の高値であったことである(図5B)。歯肉溝浸出液中のLDL濃度は低いので、血漿からごく一部が漏れ出ているものと思われるが、組織液中に浸み出す過程で酸化されている可能性が疑われた。

低侵襲性に採取できる歯肉溝浸出液で、酸化ストレスの状態をモニターできる可能性を考え、現在、糖尿病患者の歯肉溝浸出液中の酸化LDLについて検討している。これにより全身性の代謝異常と組織局所での酸化ストレスに関わりを明らかにしていきたい。歯肉溝浸出液は、低侵襲的に採取できる生体試料であり、今後の臨床診断法の一つとして応用が広がる可能性も期待できる。

酸化LDLは口腔内の炎症反応に関わっている可能性がある。歯肉上皮由来の培養細胞株Ca9-22に酸化LDLを添加すると、NF- κ の活性化を介してIL-8やPGE₂の産生が亢進した³⁰⁾。酸化LDLは血管組織の細胞に作用するだけでなく、より広範な組織の細胞においても炎症起因物質として関わる可能性が考えられる。

4. まとめ

生体内酸化LDLの存在と病態の関係についてのエビデンスが蓄積されつつあり、近年では、酸化LDLが動脈硬化の発症促進要因であると積極的に考えられる条件が強まっている。動脈硬化発症の機序解明、低侵襲性の検査法の開発、より早期の診断に向けた試みが、今後求められていくと思われる。一旦は見直しの時期を経た酸化LDL仮説は、新たな展開の段階に進もうとしている。

謝 辞

今回紹介した一連の研究は、昭和大学薬学部生物化学教室の山口准教授、小浜助教、加藤助教、大学院生が進めてきたものであり、また学内外の多くの方々との共同研究によるものです。この研究に関わって下さった皆様に厚く感謝申し上げます。

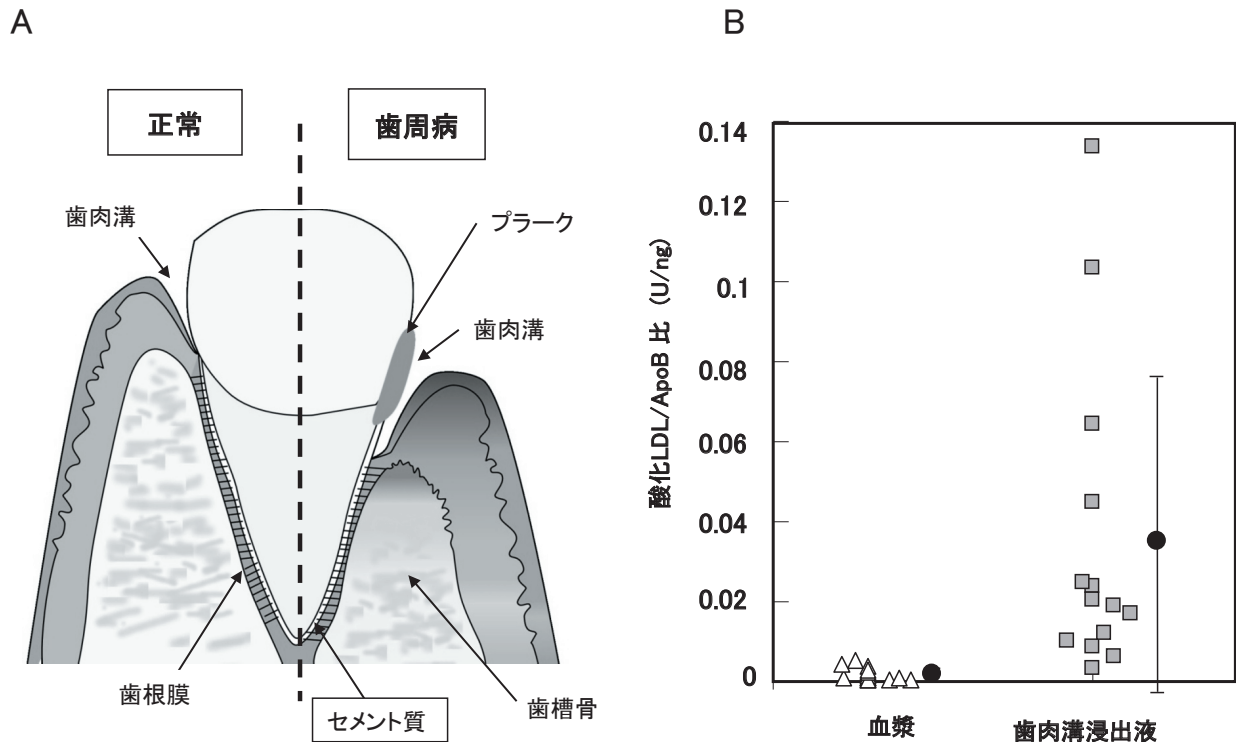


図5

歯肉溝浸出液中に酸化LDLが存在する。(A)正常および歯周病における歯肉の状態を示した模式図。歯が歯肉に埋まった部分は、歯根膜という組織で強く結合し固定されている。歯周病では、歯と歯肉の間の隙間が歯肉溝に歯周病原菌が感染しプラークを形成する。歯肉の炎症が進み、歯槽骨が溶けて細くなり、歯肉も退縮して位置が低くなり、歯肉溝が深くなる。歯肉溝浸出液は、歯肉からしみだしてくる微量の組織液であるが、低侵襲性に採取可能である。(B)健康者の血漿および歯肉溝浸出液中の酸化LDL レベル。DLH3 抗体を用いたサンドイッチ ELISA法で、歯肉溝浸出液中に酸化LDLが検出され、しかも同じ被検者の血漿酸化LDLの約17倍も高い値であった。(文献29より一部改変して引用。)

文 献

- 1) 板部洋之：酸化リポ蛋白質と病態，蛋白質・核酸・酵素，44，1247-1252，1999
- 2) Greaves, D. R. and Gordon, S.: Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors., J. Lipid Res., 46, 11-20 (2005)
- 3) Witztum, J.L. and Steinberg, D.: Role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis., J. Clin. Invest., 88, 1785-1792, (1991)
- 4) Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s., Nature, 362, 801-809 (1993)
- 5) van Berkel, T. J. C. , de Rijke, Y. B. and Kruijtit, J. K.: Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats., J. Biol. Chem., 266, 2282-2289 (1991)
- 6) Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., et al.: A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholine and polypeptides., J. Biol. Chem., 269, 15274-15249 (1994)
- 7) Itabe, H., Yamamoto, H., Imanaka, T., et al.: Oxidized phosphatidylcholines that modify proteins. Analysis by anti-oxidized low density lipoprotein monoclonal antibody., J. Biol. Chem., 271, 33208-33217 (1996)
- 8) Ehara, S., Ueda, M., Naruko, T., et al.: Oxidized low density lipoprotein relates to plaque destabilization in human coronary atherosclerotic lesions., Circulation, 103, 1955-1960 (2001)
- 9) Itabe, H., Yamamoto, H., Imanaka, T., et al.: Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal

- antibody., *J. Lipid Res.*, 37, 45-53 (1996)
- 10) Kohno, H., Sueshige, N., Oguri, K., et al.: Simple and practical sandwich-type enzyme immunoassay for human oxidatively modified low density lipoprotein using antioxidantized phosphatidylcholine monoclonal antibody and antihuman apolipoprotein-B antibody., *Clin. Biochem.* 33, 243-253 (2000)
- 11) Naruko, T., Ueda, M., Ehara, S., et al.: Persistent high levels of plasma oxidized low-density lipoprotein after acute myocardial infarction predict stent restenosis., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26, 877-883 (2006)
- 12) Uno, M., Kitazato, K. T., Nishi, K., et al.: Raised plasma oxidised LDL in acute cerebral infarction., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 74, 312-316 (2003)
- 13) Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., et al.: Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21, 844-848 (2001)
- 14) Tsimikas, S., Bergmark, C., Beyer, R. W., et al.: Temporal increases in plasma markers of oxidized lowdensity lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes., *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41, 360-370 (2003)
- 15) Itabe, H. and Ueda, M.: Measurement of plasma oxidized low-density lipoprotein and its clinical implications., *J. Atheroscler. Thromb.*, 14, 1-11 (2007)
- 16) Vivekananthan, D. P., Penn, M. S., Sapp, S. K., et al.: Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials., *Lancet*, 361, 2017-2023 (2003)
- 17) Milman, U., Blum, S., Shapira, C., et al.: Vitamin E supplementation reduces cardiovascular events in a subgroup of middle-aged individuals with both type 2 diabetes mellitus and the haptoglobin 2-2 genotype. A prospective double-blinded clinical trial., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 28, 341-347 (2008)
- 18) Ishikawa, K., Sugawara, D., Wang, X.-P., et al.: Heme oxygenase-1 inhibits atherosclerotic lesion formation in LDL-receptor knockout mice., *Circ. Res.*, 88, 506-512 (2001)
- 19) Park, J. G., Yoo, J. Y., Jeong, S. J., et al.: Peroxiredoxin 2 deficiency exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice., *Circ. Res.*, 109, 739-749 (2011)
- 20) Kato, R., Mori, C., Kitazato, K., et al.: Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29, 33-39 (2009)
- 21) Bergmark, C., Dewan, A., Orsoni, A., et al.: A novel function of lipoprotein [a] as a preferential carrier of oxidized phospholipids in human plasma., *J. Lipid Res.*, 49, 2230-2239 (2008)
- 22) Tsimikas, S., Clopton, P., Brilakis, E. S., et al.: Relationship of oxidized phospholipids on apolipoprotein B-100 particles to race/ethnicity, apolipoprotein (a) isoform size, and cardiovascular risk factors: results from the Dallas Heart Study., *Circulation*, 119, 1711-1719 (2009)
- 23) Perombelon, Y. F., Soutar, A. K., Knight, B. L.: Variation in lipoprotein (a) concentration associated with different apolipoprotein (a) alleles., *J. Clin. Invest.*, 93, 1481-1492 (1994)
- 24) Obama, T., Kato, R., Masuda, Y., et al.: Analysis of modified apolipoprotein B-100 structures formed in oxidized low-density lipoprotein using LC-MS/MS., *Proteomics*,

- 7, 2132-2141 (2007)
- 25) Dietrich, T., Jimenez, M., Krall Kaye, E. A., et al.: Age-dependent associations between chronic periodontitis/edentulism and risk of coronary heart disease., *Circulation*, 117, 1668-1674 (2008)
- 26) Lalla, E., Lamster, I. B., Hofmann, M. A. et al.: Oral infection with periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, 1405-1411 (2003)
- 27) Teeuw, W. J., Gerdes, Victor E. A. and Loos, B. G.: Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients. A systematic review and meta-analysis., *Diabetes Care*, 33, 421-427 (2010)
- 28) Tonetti, M. S., D'Aiuto, F., Nibali, L., et al.: Treatment of periodontitis and endothelial function., *N. Engl. J. Med.*, 356, 911-920 (2007)
- 29) Sakiyama, Y., Kato, R., Inoue, S., et al.: Detection of oxidized low-density lipoproteins in gingival crevicular fluid from dental patients., *J. Periodont. Res.* 45, 216-222 (2010)
- 30) Nagahama, Y., Obama, T., Usui, M., et al.: Oxidized low-density lipoprotein-induced periodontal inflammation is associated with up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 566-571 (2011)

Re-evaluation of the oxidized LDL hypothesis: Prospects for oxidized LDL found in vivo

Hiroyuki Itabe

Department of Biological Chemistry, Showa University School of Pharmacy

Abstract

The oxidized LDL hypothesis has been widely accepted as a possible explanation for the occurrence and development of atherosclerosis. This study demonstrates that oxidative modification of LDL is an important factor in cardiovascular diseases by determining small amounts of oxidized LDL present in human plasma. However, it has been epidemiologically difficult to prove any antiatherogenic effects of antioxidative vitamins. Recent research provides new information on this aspect, and the clinical relevance of oxidized LDL requires reevaluation. It is possible that oxidized LDL may be useful as biomarker of oxidative stress in vivo.

Key words: oxidized LDL, atherosclerosis, monoclonal antibody, diagnosis, periodontal diseases

Received 10 February 2012 ; accepted 21 February 2012

